

**DIADENOSINTETRAPHOSPHAT (Ap_4A)
NACH PARTIELLER HEPATEKTOMIE UND
HYDROXYHARNSTOFF-SYNCHRONISATION DER
DNS-SYNTHESE IN DER RATTENLEBER**

ANNA HEDL

1984



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554609_0001

Aus dem Pathologischen Institut
der Universität München
Direktor: Prof. Dr. M. Eder

Diadenosintetraphosphat (Ap_4A)
nach partieller Hepatektomie und Hydroxyharnstoff-
Synchronisation der DNS-Synthese in der Rattenleber

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Anna Hedl

München 1984

Berichterstatter: Prof. Dr. Hartmut Rabes

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Max Eder

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Walter Brendel

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 15. 7. 1986

Herrn Prof. Dr. H.M. Rabes danke ich für die Themastellung und wertvolle Unterstützung bei dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. F.Grummt danke ich für anregende Hinweise und Diskussionen.

Frau Dr. Ch.Schuster und Frau M. Wendt danke ich für die Durchführung der partiellen Hepatektomien und der Hydroxyharnstoff-Infusionen.

Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Deutschen Stiftung für Krebsforschung durchgeführt.

Material und Firmen

Hydroxyharnstoff	HU reinst Serva Feinbiochemica Heidelberg
Perfusor IV	Braun-Melsungen
Perfusorbesteck	Nr. 72500 Braun-Melsungen
Infusionsleitungen für die HU-Infusion	Nr. 72295 Braun-Melsungen
Ap ₄ A	Boehringer Mannheim
Alkalische Phosphatase	aus Kälberdarm Boehringer Mannheim
³ H-Ap ₄ A	hergestellt von Prof. Grummt
Phosphodiesterase	aus Crotalus adamanteus Worthington
ATP-Monotoring Reagent	Luciferin-Luciferase LKB Instruments
DEAE-Cellulose	DE 52 Whatman
Zentrifuge	Beckmann J 21 B
Lyophilisator	Leybold-Heraeus GT2
Szintillations- messgerät	Packard Modell 2425
Chromatographiesäulen	Biorad
Pumpe	Abimed

Abkürzungen

Ap ₄ A	Diadenosin-5', p ¹ , p ⁴ , -tetraphosphat
HU	Hydroxyharnstoff
PDE	Phosphodiesterase
BHK	Baby Hamster Kidney Cell
EGF	Epidermal Growth Factor
DEAE	Diäthylaminoäthyl
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Methoden	
2.1	Partielle Hepatektomie	8
2.1.1	Versuchstiere	8
2.1.2	Operationsmethode	8
2.1.3	Zeitliche Aufarbeitung	9
2.2	Hydroxyharnstoff (HU)-Infusion	10
2.2.1	Infusionsapparatur	11
2.2.2	Vorbereitung der Ratten für die HU-Infusion	11
2.2.3	Konzentration der HU-Infusion	13
2.2.4	Zeitplan der HU-Infusion	14
2.3.	Bestimmung des Ap ₄ A-Gehaltes	15
2.3.1	Schematische Darstellung	15
2.3.2	Nukleotidextraktion mit Trichloressigsäure	16
2.3.3	Alkalische Phosphatase-Verdau	17
2.3.4	Chromatographie an DEAE-Cellulose	19
2.3.5	Luciferin-Luciferase-Test	20
2.3.6	Eichkurve von ATP und Ap ₄ A	21
2.3.7	Reinigung und Aktivitätsbestimmung der Alkalischen Phosphatase	25
2.3.8	Proteinbestimmung	29
2.3.9	Interner Standard	31
2.3.10	Szintillationscocktail (Bray)	31
2.3.11	Berechnung der Ap ₄ A-Konzentration	32
3.	Ergebnisse	33
3.1	Ap ₄ A-Konzentration nach partieller Hepatektomie	33
3.2	Ap ₄ A-Konzentration in regenerierender Leber nach HU-Synchronisation der DNS-Synthese	36

3.3	Vergleich der Ap ₄ A-Konzentration in regenerie- render Leber nach partieller Hepatektomie und nach HU-Synchronisation der DNS-Synthese	40
4.	Diskussion	43
5.	Zusammenfassung	50
6.	Literatur	51

1. Einleitung

Der Zellzyklus läßt sich in 4 Phasen einteilen, die prä- und postreplikative G_1 - bzw. G_2 -Phase, die DNS-Synthese-Phase S und die Mitose-Phase M.

Die Kenntnis der Regulationsmechanismen des Zellzyklus ist von theoretischem und praktischem Interesse, da eine Analyse der Kontrolle des normalen Zellzyklus zum Verständnis entarteter Zellvermehrung beitragen könnte.

Untersuchungen zur Proliferationskontrolle ergaben, daß Nukleotide wie cAMP, cGMP, ATP und GTP in die Regulation der DNS-Synthese involviert sind (Pastan et al., 1975; Skoog und Nordenskjöld, 1971; Skoog et al., 1973; J. Grummt et al., 1976; Meuth et al., 1976). Zellfusionsexperimente zeigten, daß die Initiation der DNS-Replikation unter positiver Kontrolle eines cytoplasmatischen Faktors steht (Graham et al., 1966; Johnson und Harris, 1969; Rao und Johnson, 1970), der in der G_1 -Phase synthetisiert und akkumuliert wird und bei Überschreitung einer kritischen Schwellenkonzentration die DNS-Synthese auszulösen vermag (Rao et al., 1977; Rao et al., 1978).

Ein solcher Faktor, dem eine solche Signalfunktion zugeordnet werden könnte, ist das ungewöhnliche Purinnukleotid Diadenosin-5', 5'', p^1 , p^4 , -tetraphosphat (Ap_4A), das von Zamecnik et al. entdeckt und charakterisiert wurde. Ap_4A wird als Nebenprodukt des ersten Schrittes der Proteinsynthese gefunden. Ap_4A wird dann synthetisiert, wenn die Rückreaktion der Aminoacyl-tRNA-Synthetase nicht mit Pyrophosphat, sondern mit ATP im ATP-Überschuß abläuft (Zamecnik et al., 1966; Randerath et al., 1966; Scott und Zamecnik, 1969).

Ap_4A konnte in tierischen, pflanzlichen und bakteriellen Zellen nachgewiesen werden. Die Konzentration von Ap_4A betrug in ruhenden bzw. langsam wachsenden Zellen $10^{-8}M$, in schnell proliferierenden Zellen $10^{-6}M$.

Diese Fluktuation des Ap₄A-Pools führte zu der Annahme, daß Ap₄A ein positives Wachstumssignal sein könnte (Rapaport und Zamecnik, 1976).

Grummt konnte mit seinen Experimenten an Baby Hamster Kidney Cells (BHK-Zellen) zeigen, daß Ap₄A tatsächlich die DNS-Synthese auszulösen vermag. Zugabe von Ap₄A zu permeabilisierten G₁-arretierten BHK-Zellen (mit sehr niedriger DNS-Synthese) erhöht signifikant die Replikation. Durch spezifische Inhibitoren der Replikation, Auszählen der Duplikationsringe und Nachweis der diskontinuierlichen DNS-Synthese konnte gezeigt werden, daß Ap₄A in erster Linie die replikative DNS-Synthese und nicht die Reparatursynthese aktiviert (F. Grummt, 1978; F. Grummt, 1979).

Strukturanaloga wie Ap₃A, Ap₅A, Gp₄G u.a. zeigten keine stimulierende Wirkung. Außerdem konnte in einem Kontroll-experiment gezeigt werden, daß die stimulierende Wirkung durch die Spaltung von Ap₄A in ATP und AMP durch die Phosphodiesterase aufgehoben werden kann (F. Grummt, 1979).

Um den molekularen Mechanismus der Wirkungsweise von Ap₄A zu verstehen, wurde das intrazelluläre Target von Ap₄A charakterisiert. Aufgrund der Ko-Purifikation von DNS-Polymerase α -Aktivität und der Ap₄A-Bindungsaktivität konnte gezeigt werden, daß die 57.000 kd Untereinheit der DNSPolymerase α der Bindungsort für Ap₄A ist (F. Grummt et al., 1979).

Ebenfalls besitzt die hoch- und niedermolekulare Form der DNS-Polymerase α aus humanen HeLa-Zellen eine hochspezifische, nichtkovalente Ap₄A-Bindungsaktivität (Rapaport et al., 1981).

Weiterhin gibt es Ergebnisse, daß Ap₄A als Primer für die DNS-Synthese mithilfe HeLa-DNS-Polymerase mit polydT als Template und doppelsträngigem Oktadekamer als Template fungiert (Rapaport et al., 1981; Zamecnik et al., 1982).

Die K_D für Ap_4A mit Kalbsthymus-DNS-Polymerase beträgt $0,27 \mu M$. Diese Konzentration würde wahrscheinlich genügen, um an dieses Enzym zu binden und um es zu aktivieren.

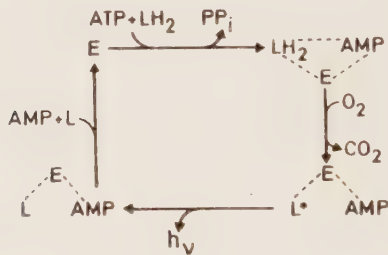
Diese Vermutungen wurden auch durch die Kinetik der Abnahme des "committed state" in 3T3 Zellen unterstützt. Das (1981) zeigte die Bildung eines "committed state", also eines "verpflichtenden", aber präreplikativen Zustandes, wenn 3T3 Zellen gleichzeitig einem externen Stimulator (Serum) und einem Inhibitor (Hydroxyharnstoff), der den Eintritt in die S-Phase hemmt, ausgesetzt werden. Die verschiedenen langen Inkubationszeiten mit dem Inhibitor nach Entfernung des Stimulators resultierte in einer Abnahme des "committed state" dieser Zellen. Die Abnahme war eine Reaktion 1. Ordnung.

Im Gegensatz dazu fanden Weinmann-Dorsch (1984), daß der "committed state" auf einer kritischen Konzentration eines induzierenden Moleküls beruht. Da die Abnahme eines "committed state" und die Verminderung der Ap_4A -Konzentration nicht der gleichen Kinetik erfolgt, könnte dies dafür sprechen, daß der Aufbau der kritischen Schwellenkonzentration eines labilen Induktors der DNS-Synthese für den Eintritt in die DNS-Synthese notwendig ist und daß dieses Initiator-molekül Ap_4A ist.

Wie bereits oben beschrieben, konnte gezeigt werden, daß der Ap_4A -Pool in schnell wachsenden Zellen um das hundertfache höher ist als in ruhenden Zellen. Die dafür verwendete Methode beruhte auf der Messung des Einbaus radioaktiv markierter Ap_4A -Vorstufen (Adenosin und Phosphat, Rapport und Zamecnik, 1976). Da nur neusynthetisiertes Ap_4A erfaßt werden konnte und somit keine Aussage über bestehende und abnehmende Ap_4A -Pools erlaubte, war diese Methode nur von limitierter Anwendbarkeit.

Daher wurde ein neues Bestimmungsverfahren, die Luciferin-Luciferase-Methode, entwickelt, mit der man sowohl Konzentrationsabnahmen als auch Konzentrationszunahmen erfassen konnte, die auch in picomolaren Bereichen hochsensitiv war und zur Verlustberechnung einen internen Standard enthielt.

Die Methode zur Ap_4A -Bestimmung basiert auf der Spaltung von Ap_4A in ATP und AMP durch die Phosphodiesterase und anschließender quantitativer Bestimmung des dabei entstandenen ATP mit dem Luciferin-Luciferase-System. Dabei regt ATP das Luciferin-Luciferase-System zur Emission von Licht an (De Luca und McElroy, 1978):



LH_2	Luciferin
L	Oxiluciferin
L^*	Oxiluciferin, elektronisch angeregt
E	Luciferase

Die dabei emittierten Photonen werden in einem Lumino-meter gemessen (Lundin und Thore, 1975; Lundin et al, 1976; Lundin et al., 1977).

Um Ap_4A in Zellen messen zu können, wird ein Zellnukleotid-extrakt durch Proteinfällung hergestellt. Da das im Zell-extrakt vorliegende ATP (10^4 - 10^6 mal höhere Konzentration als Ap_4A) die Luciferase stören würde, wird ATP durch Alkalische Phosphatase verdaut. Die Abbauprodukte werden durch Ionenaustauschchromatographie (DEAE-Cellulose) von Ap_4A abgetrennt. Während des gesamten Prozesses wird ^3H - Ap_4A als interner Standard mitgeführt.

Mit dieser Methode wurden verschiedene Wachstums-, Entwicklungs- und Transformationszustände gemessen (Weinmann-Dorsch, 1981; Weinmann-Dorsch et al., 1984.)

So betrug in ruhenden BHK-Zellen und in 3T3-Zellen die Ap_4A -Konzentration $0,01 \mu\text{M}$. Nach mitogener Stimulation durch Serumzugabe erhöhte sich die Ap_4A -Konzentration auf das 1000fache und erreicht in der S-Phase ein Maximum von $10 \mu\text{M}$. In Zellen ohne G_1 -Phase (Chinese Hamster Lung Cells) war ein konstitutiv höherer Ap_4A -Pool in ruhenden Zellen ($0,2 \mu\text{M}$) und eine nur 30fache Zunahme während der S-Phase zu beobachten (Weinmann-Dorsch, 1981; Weinmann-Dorsch et al., 1984).

Proliferation kann in vitro durch Serumzugabe oder zum Beispiel auch durch Transformation mit Viren (Rous Sarcoma Virus) induziert werden. Es wurde untersucht, ob das Verhalten des Ap_4A -Pools von der Art der mitogenen Stimulation abhängig ist. Es zeigt sich, daß unabhängig von der Art der Stimulation eine strenge Korrelation zwischen Zunahme der Ap_4A -Konzentration und der DNS-Synthese besteht (Weinmann-Dorsch, 1981; Weinmann-Dorsch et al., 1984).

Ebenso verhält sich der Ap_4A -Pool in mit Interferon behandelten Zellen (HeLa): die Ap_4A -Konzentration fällt bei Interferonbehandlung um 90 % ab (Weinmann-Dorsch, 1981; Weinmann-Dorsch et al., 1984).

Die Ap₄A-Konzentration wurde auch in Leukämiezellen gemessen. Sie entspricht der Konzentration exponentiell wachsender Zellen (Ogilvie, 1981).

Diese Ergebnisse demonstrieren eine Fluktuation des Ap₄A-Pools in Korrelation zum Proliferationszustand bzw. zur DNS-Synthese.

Die geschilderten Experimente wurden an Zellkulturen in vitro durchgeführt. Von besonderem Interesse ist jedoch, ob Ap₄A auch im lebenden Organismus, d.h. in vivo, vorhanden ist. Dazu wurden Organe der Ratte (Gehirn, Herz, Leber, Niere, Testis) untersucht. Organe besitzen nach Abschluß ihres Größenwachstums keine (bzw. geringe) Teilungsfähigkeit und sind somit bezüglich ihrer Proliferationsaktivität ruhende Zellen. Entsprechend der Konzentration in ruhenden Zellen betrug die Ap₄A-Konzentration $3 \times 10^{-8} \text{M}$ (Hedl, 1981; Weinmann-Dorsch, 1981). Weiterhin ist die Frage von Bedeutung, ob die Ap₄A-Konzentration auch in vivo mit dem Proliferationszustand korreliert. Als proliferatives System zur Untersuchung dieser Frage eignet sich regenerierende Rattenleber.

In der Kontrolle der Hepatocytenregeneration sind nach Lef-fert die Faktoren EGF, Insulin und Glucagon beteiligt (Lef-fert et al., 1982). Aktivierende Wirkung besitzen auch humo-rale und metabolische Faktoren (Verly, 1976), deren Effekte durch Austauschtransfusion zwischen normalen und partiell hepatektomierten oder durch Seruminjektion untersucht wurden. wurden.

Die Umsetzung dieser Faktoren in eine molekulare Antwort, die DNS-Synthese und/oder Zellteilung auszulösen vermag, ist jedoch noch nicht geklärt.

Hierbei könnte Ap₄A als Trigger der DNS-Replikation eine Rolle spielen.

In regenerierender Leber ist der Beginn der hepatozellulären Proliferation eine Funktion der intralobulären Lokalisation (Rabes, 1977). So sind 18h nach partieller Hepatektomie 80 % der DNS-synthetisierenden Hepatocyten im peripheren, 15 % im intermediären und der Rest im zentralen Läppchendrittel zu finden (Rabes und Tuczek, 1970).

Die proliferative Antwort auf den Wachstumsstimulus "partielle Hepatektomie" ist also heterogen. Der Zellpool setzt sich somit aus ruhenden und proliferativen Zellen zusammen, die aufgrund oben beschriebener Experimente unterschiedliche Ap_4A -Konzentrationen besitzen könnten.

Ein einheitlicher Zellpool an Zellen im gleichen Zellzyklusstadium läßt sich durch Hydroxyharnstoff (HU)-Infusionen erzielen (Rabes et al., 1975; Rabes et al., 1977). HU inhibiert die Zellproliferation durch Hemmung der DNS-Synthese, in dem die Reduktion von Ribonukleotiden zu Desoxyribonukleotiden durch reversible Inaktivierung der Ribonukleosid-Diphosphat-Reduktase verhindert wird (Young und Hodas, 1964; Schwarz et al., 1965; Pfeiffer und Tolmach, 1967; Philips et al., 1967; Sinclair, 1967; Krakoff et al., 1967).

Durch Dauerapplikation von HU im Anschluß an eine partielle Hepatektomie ist es möglich, die Hepatocyten an der G_1 -Grenze zu akkumulieren. Nach Aufhebung dieses Blocks treten die Zellen mit einem erhöhten Grad an Synchronie in die DNS-Synthese ein (Rabes et al., 1977).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Verhalten des Ap_4A -Pools in regenerierender Leber und in regenerierender Leber nach HU-Synchronisation der DNS-Synthese untersucht werden.

2. Methoden

2.1. Partielle Hepatektomie

2.1.1. Versuchstiere

Männliche Wistarratten (AF-Han) eigener Zucht wurden in klimatisierten Tierställen bei normalem Licht-Dunkelrhythmus in Macrolonkäfigen gehalten. Sie erhielten Altromin^R-Standard-Diät und Wasser ad libitum. Für die Experimente wurden Tiere mit einem Gewicht von ca. 200 g verwendet.

2.1.2. Operationsmethode

Die partielle Hepatektomie wurde nach Higgins und Anderson (1931) durchgeführt. Der Operationszeitpunkt lag in den Vormittagsstunden (8-12 Uhr), um die circadianen Schwankungen der Proliferation in den verschiedenen Versuchsgruppen gleich zu halten.

Die Leber der Ratte besteht aus 4 Hauptlappen. Der mediane Lappen wird durch eine longitudinale Fissur in einen rechten zentralen und einen linken zentralen Lappen geteilt.

Der rechte zentrale Lappen wird flankiert durch den rechten lateralen Lappen, der durch eine transversale Fissur in 2 kleine Lappen, von denen der posteriore Lappen den anterioren Pol der rechten Niere bedeckt, geteilt wird.

Der große linke laterale Lappen liegt direkt hinter dem linken zentralen Lappen.

Der kaudale Lappen wird ebenfalls durch eine transversale Fissur geteilt. Die dadurch entstandenen kleinen Lappen liegen in der Kurvatur des Magens und im kleinen Netz.

Bei der partiellen Hepataktomie werden der mediane Lappen mit seinen 2 zentralen Anteilen und der linke laterale Lappen entfernt. Das entspricht 66 % der gesamten Leber.

Alle Operationen wurden in Äthernarkose durchgeführt. Die Bauchdecke der Ratte wird rasiert und mit 70 % Äthanol desinfiziert. Die Bauch- und Muskeldecke wird in 2 Schichten entlang der Linea alba bis zum Processus xiphoideus des Sternums incidiert. Der mediane und linke laterale Lappen werden am Hilus abgebunden und reseziert. Dadurch werden 66 % der Leber entfernt. Das Abdomen wird in 2 Schichten verschlossen.

Die postoperative Mortalität betrug weniger als 1 %.

2.1.3. Zeitliche Aufarbeitung

Die partiell hepatektomierten Ratten wurden jeweils nach 5, 10, 15, 20, 25, 30 und 35 h durch Ausblutung in Äthernarkose getötet. Pro Zeitpunkt werden je 2 Tiere verwendet. Bei Kontrolltieren ohne partielle Hepatektomie wurde lediglich eine Laparotomie durchgeführt.

Die Lappen der regenerierenden Leber wurden entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die anschließende Nukleotidextraktion erfolgte wie in 2.3. beschrieben.

2.2. Hydroxyharnstoff (HU)-Infusion

Das Ziel der HU-Infusion war die zeitlich begrenzte Blockierung des Beginns der DNS-Synthese in regenerierender Leber nach partieller Hepatektomie. Um dies zu erreichen, wurde HU zu einem Zeitpunkt zugeführt, zu dem die Hepatocyten noch nicht in die S-Phase eingetreten waren. Da die DNS-Synthese 15-18 h nach partieller Hepatektomie beginnt (Rabes und Tuczek, 1970), wurde als Zeitpunkt für den Beginn der HU-Infusion 14 h nach partieller Hepatektomie gewählt. Die Methode der HU-induzierten Synchronisation der DNS-Synthese wurde nach Rabes et al. (1977) durchgeführt. Das Prinzip dieser Methode ist die Applikation einer höher dosierten i.v.-Vorinjektion und einer anschließenden i.v.-Dauerinfusion von HU im Anschluß an eine partielle Hepatektomie.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde den Versuchstieren der Gruppe 1 HU-Infusionen unterschiedlicher Dauer (1, 6, 11, 16 h) verabreicht. Die Tiere der Gruppe 2 hatten nach 16-stündiger HU-Infusion ein unterschiedlich langes freies Intervall (1, 2, 4, 6, 8, 12 h nach Infusionsende) bis zur Entnahme der Leber zur Ap₄A-Bestimmung.

2.2.1. Infusionsapparat

Für die HU-Infusion wurden Perfusoren mit 5 Spritzenhalterungen verwendet. An den Perfusoren war die Vorschubgeschwindigkeit variierbar, so daß niedrige Förderraten möglich waren. Die Vorschubgeschwindigkeit für die HU-Infusion betrug 0,56 ml/h.

Die Spritzen (20 ml) wurden nach Einfüllen der HU-Lösung in der Perfusor eingespannt und mit den Infusionsleitungen verbunden. Durch kurzzeitig hohen Vorschub füllten sich die Leitungen.

Während der Infusion befand sich der Perfusor mit den HU gefüllten Spritzen im Kühlschrank.

2.2.2 Vorbereitung der Ratten für die HU-Infusion

Für die HU-Infusion wurden die Ratten mit Äther narkotisiert, einzeln in Macrolonkäfigen (22x17x12 cm) in Seitenlage gebracht und für die i.v.-Infusion in die Schwanzvene vorbereitet. Die Infusion erfolgt genau entsprechend den Angaben von Iseler (1977).

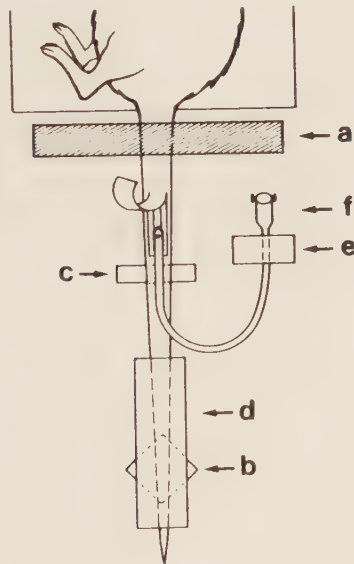


Abb. 1: Vorbereitung der Ratten für die HU-Infusion

Das Tier befindet sich narkotisiert in Seitenlage in einem Käfig. Der Schwanz ist mit Pflasterstreifen (a-e) befestigt, die Vene ist freipräpariert und die Infusionsnadel gelegt. (f) Anschlußstück für das Perfusorbesteck. Abbildung aus Iseler (1977).

2.2.3. Konzentration der HU-Infusion

Das Gewicht der Ratten wurde nach partieller Hepatektomie vor Beginn der HU-Infusion nochmals bestimmt. Die für die Infusion erforderliche Menge an HU wurde kurz vor der Infusion abgewogen und in physiologischer Kochsalzlösung gelöst.

a) Konzentration der Vorinjektion

Eine i.v.-Vorinjektion von HU war notwendig, um durch einen hohen Plasmaspiegel auch die ersten in die S-Phase ein tretenden Hepatocyten in G_1 zu blockieren. Die Konzentration betrug das 1.35fache der stündlich infundierten Menge (1.69 mM). Die Applikation erfolgte in die Schwanzvene.

b) Konzentration der HU-Infusion

Die Konzentration betrug 1.25 mMol/kg/h, bei einer Vor schubgeschwindigkeit von 0.56 ml/h. Aus einer Stammlösung (4.4124 g/100 ml) wurde durch Mischen mit physiolo gischer Kochsalzlösung die Infusionslösung hergestellt. Volumina und Konzentration der Stammlösung, Kochsalzlösung und Infusion wurden aus einer dafür berechneten Tabelle entnommen.

Die HU-Lösung wurde in die Perfusorspritze gefüllt und die entsprechende NaCl-Lösung hinzupipettiert. Das Endvolumen betrug 13 ml.

2.2.4. Zeitplan der HU-Infusion

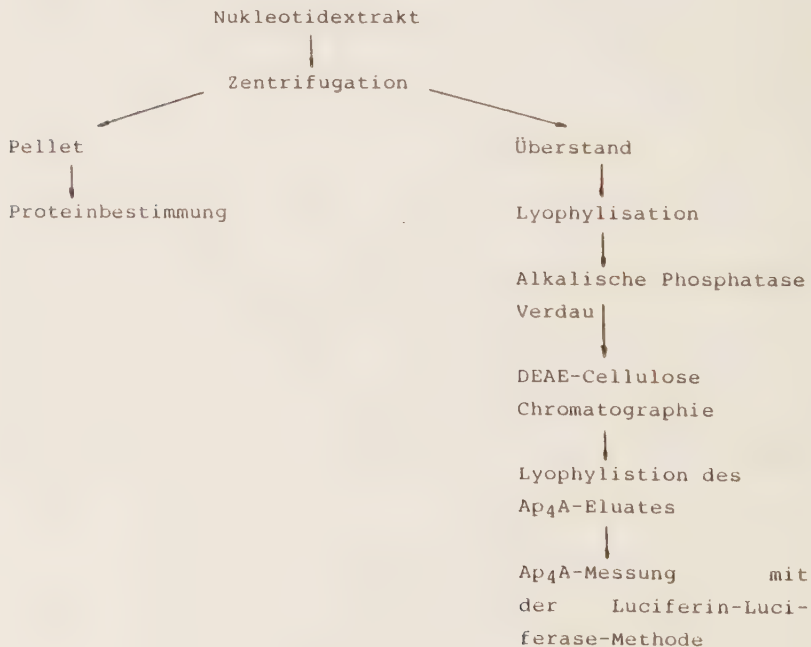
Die HU-Infusion begann 14 h nach partieller Hepatektomie. Für die Gruppe 1 betrug die Infusionsdauer 1, 6, 11 und 16 h. Die Tiere wurden danach getötet und die Leber wie in 2.3. beschrieben verarbeitet. Für die Gruppe 2 betrug die Infusionsdauer 16 h. Die Tiere wurden 1, 2, 4, 6, 8 und 12 h nach Ende der HU-Infusion getötet und die Leber nach 2.3. verarbeitet.

	Zeit nach partieller Hepatektomie	Dauer der HU-Infusion
Gruppe 1	15	1
	20	6
	25	11
	30	16
	Zeit nach partieller Hepatektomie	Zeit nach Ende der 16-stündigen HU-Infusion
Gruppe 2	31	1
	32	2
	34	4
	36	6
	38	8
	42	12

2.3. Bestimmung des Ap_4A -Gehaltes

Eine genaue Beschreibung der Methode findet sich bei Hedl (1981). Im folgenden sollen in Anlehnung an die ausführliche Darstellung (Hedl, 1981) die wichtigsten Schritte beschrieben werden.

2.3.1. Schematische Darstellung



2.3.2. Nukleotidextraktion mit Trichloressigsäure

Nach Tötung der Ratte wurde die Leber sofort entnommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren, um so eventuell ablaufende Abbauprozesse zu stoppen. Diese Leber wurde zur Gewinnung der Zellnukleotide in 10-15 ml eiskalter Trichloressigsäure (TCA) zerkleinert und zur optimalen Nukleotidextraktion für 15 min. bei 4° C (Eisbad) stehen gelassen.

Als interner Standard wurde 2 µl ^3H -Ap₄A (700000 cpm) hinzugefügt.

Durch die TCA-Behandlung wurden die im alkalischen Bereich löslichen Proteine ausgefällt, während die im sauren Milieu löslichen Nukleotide in dem sauren Überstand verbleiben. Dieser Niederschlag wurde in einer Beckmann-Zentrifuge bei 10000 g für 5 min. abzentrifugiert, nochmals resuspendiert und zentrifugiert. Beide Überstände wurden in einem Schliffkolben vereinigt. TCA wurde durch Ausschüteln mit Äther entfernt und die Ätherphase abgesaugt.

Der Nukleotidextrakt wurde in einem Schliffkolben in flüssigem Stickstoff eingefroren und an einer Gefrieretrocknungsanlage vom Typ Leybold-Heraeus GT 2 lyophilisiert.

Das Pellet der TCA-Extraktion wurde mit 30 ml 1N NaOH versetzt und zur Proteinbestimmung verwendet.

Das Lyophilisat des Zellnukleotidextraktes wurde in 3 ml H₂O aufgelöst und anschließend der ATP-Verdau durch Alkalische Phosphatase angesetzt.

2.3.3. Alkalische Phosphatase Verdau

Alkalische Phosphatase (aus Kälberdarm) diente zum Abbau des in den Zellnukleotidextrakt vorliegenden ATP-Pools, der den Nachweis von Ap_4A durch das Luciferin-Luciferase-System stören würde, da ATP das Substrat der Luciferase ist.

Der lyophilisierte Nukleotidextrakt wurde in 3 ml H_2O aufgenommen und mit ca. 30 μl 1M Tris-Lösung auf pH 7.5 - 8 gebracht. Nach Zugabe von 30 μl 0.1 M MgCl_2 - und 30 μl 0.01 M ZnCl_2 -Lösung wurde ATP durch 20 μl Alkalische Phosphatase (4U) verdaut. Der ATP-Abbau wurde luminometrisch verfolgt (Abb. 2).

Wie aus Abb. 2 ersichtlich, war eine Inkubationszeit von 35 h erforderlich um den zellulären ATP-Pool abzubauen. Alle weiteren Nukleotidextrakte wurden daher für 35 h mit Alkalischer Phosphatase inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde zur Kontrolle die ATP-Konzentration nochmals bestimmt.

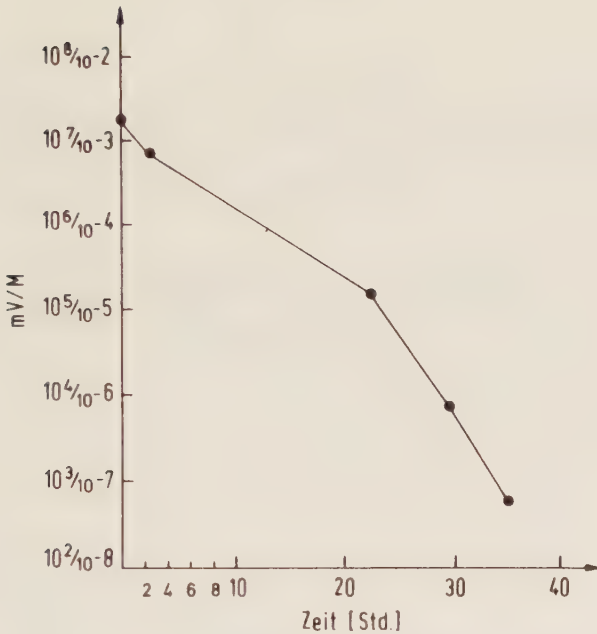


Abb.2 Abbau des ATP-Pools im Zellnukleotidextrakt aus Rattenleber durch Alkalische Phosphate.

Die verwendete Leber stammt aus dem Kontrolltier, bei dem lediglich eine Laparotomie durchgeführt wurde (Null-Wert, siehe 2.1.3.). Der ATP-Pool wurde mit dem Luciferin-Luciferase-Test bestimmt (siehe 2.3.5.) und zu Beginn, nach 2h, 20h, 30h und 35h durchgeführt.

Abszisse: Inkubationsdauer in Stunden

Ordinate: Spannung (mV) und die dazu proportionale Molarität (M), wobei die Umrechnung durch die ATP-Eichkurve erfolgte (siehe 2.3.6.).

2.3.4. Chromatographie an DEAE-Cellulose

Die Ionenaustauschchromatographie diente zur Abtrennung der Abbauprodukte des durch Alkalische Phosphatase verdauten ATP-Pools und des noch unverdauten ATP von Ap_4A . Die Trennung erfolgte mit NH_4HCO_3 -Puffer verschiedener Konzentration.

Säulen von 15 cm Länge und 0,7 cm Durchmesser (Biorad) wurden mit in 0.12 M NH_4HCO_3 -Lösung (pH 8.2) aufgeschlemmter DEAE-Cellulose (Whatman DE 52) gefüllt und mit 20 ml 0.12 M NH_4HCO_3 -Lösung äquilibriert. Der mit alkalischer Phosphatase behandelte Nukleotidextrakt wurde mit H_2O auf 20 ml aufgefüllt und auf die Säule aufgetragen. Danach wurde mit 50 ml 0.12 M NH_4HCO_3 -Lösung gewaschen, um unverdaute ATP-Reste und Phosphate zu entfernen. Ap_4A wurde mit 30 ml 0.25 M NH_4HCO_3 -Lösung eluiert, mit flüssigem Stickstoff eingefroren und über Nacht bei -20°C an einer Gefriertrocknungsanlage von Typ Leybold-Heraeus GT 2 lyophilisiert.

Das Lyophilisat des Ap_4A -Eluates wurde in 100 μl H_2O aufgelöst und anschließend der Luciferin-Luciferase-Test durchgeführt.

Eine genaue Beschreibung der Chromatographie an DEAE-Cellulose und das Eluationsprofil der Trennung von Ap_4A von den Abbauprodukten der Alkalischen Phosphatase findet sich bei Hedl (1981).

2.3.5. Luciferin-Luciferase-Test

Das Luciferin-Luciferase-System diente zur quantitativen Bestimmung von ATP und Ap_4A . Die Messungen wurden im Luminometer durchgeführt.

Das Luciferin-Luciferase-System besteht aus dem Enzym Luciferase und seinem Substrat Luciferin, einem Phenolderivat. Dieses System spaltet ATP in AMP und Pyrophosphat (PP). Pro gespaltenem ATP-Molekül wird 1 Lichtquant emittiert. Diese emittierten Photonen werden im Luminometer an einer Photokathode in Spannung umgewandelt, über einen Amplifier verstärkt und als mV ausgedrückt. Diese Spannung (mV) ist der eingesetzten ATP- bzw. Ap_4A -Menge direkt proportional. Über eine Eichkurve (siehe 2.3.6.) läßt sich deshalb die ATP- und Ap_4A -Konzentration bestimmen.

Testansatz:

- 700 μl Puffer 0.1 M Tris Acetat, pH 7.75, 2mM EDTA
- 200 μl Luciferin-Luciferase-Lösung
- 100 μl ATP-Lösung (10^{-5} - 10^{-8} M) bzw. lyophilisiertes AP_4A -Eluat, aufgenommen in 100 μl H_2O
- 10 μl Phosphodiesterase (0.5 U)

Luciferin-Luciferase lag in Pulverform vor. Sie wurde in 10 ml H_2O aufgelöst (Sterilfiltration mit Millipore-Glasfilter).

2.3.6. Eichkurve von ATP und Ap_4A

Es wurde je eine Verdünnungsreihe von ATP und Ap_4A von 10^{-5} - 10^{-8} M hergestellt.

a) Testansatz für die ATP-Eichkurve (Abb. 3):

700 μl 0.1 M Tris Acetat, pH 7.75, 2 mM EDTA

200 μl Luciferin-Luciferase-Lösung

100 μl ATP-Lösung: 10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M

b) Testansatz für die Ap_4A -Eichkurve:

700 μl 0.1 M Tris Acetat, pH 7.75, 2 mM EDTA

200 μl Luciferin-Luciferase-Lösung

100 μl Ap_4A -Lösung: 10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M

10 μl Phosphodiesterase (PDE) (0.5 U)

Puffer, Luciferin-Luciferase-Lösung und je eine Ap_4A -Lösung wurden in der Küvette gemischt und der ATP-Background im Luminometer bestimmt.

Nach Zugabe von Phosphodiesterase wird Ap_4A in ATP und Luciferin-Luciferase verbraucht, wodurch Photonen frei werden, die sich in einer Zunahme an Spannung (mV) im Luminometer ausdrücken (Abb. 4).

Die Ap_4A -Konzentration entspricht der Differenz zwischen ATP-Background und dem Spannungsmaximum (mV) nach PDE-Zugabe (Abb. 5).

Die Ausbeute an gespaltenem ATP aus Ap_4A beträgt 50 %, da die Wahrscheinlichkeit, daß PDE ATP + AMP oder ADP + ADP aus Ap_4A spaltet sich gleich, d.h. 50 % ist.

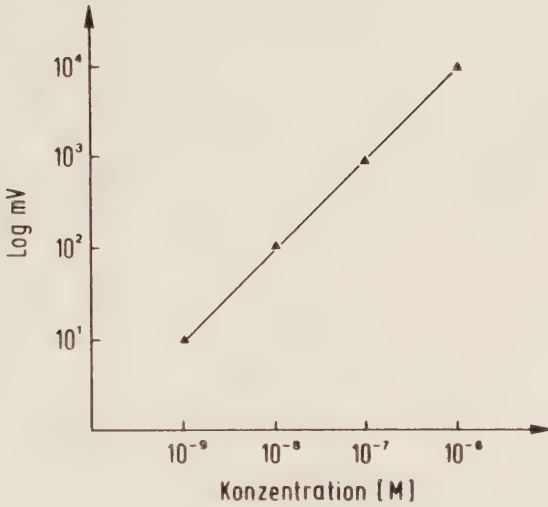


Abb. 3: Eichkurve der ATP-Bestimmung mit der Luciferin-Luciferase-Methode im Luminometer

Die ATP-Konzentration wird im Luminometer als Spannung ausgedrückt. Die Korrelation zwischen Spannung und Molarität der ATP-Konzentration wird durch die Eichkurve dargestellt. Der Luciferin-Luciferase-Test wurde mit 10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M und 10^{-8} M ATP-Lösung durchgeführt.

Konzentration (M)	Spannung (mV)
10^{-6}	10.000
10^{-7}	990
10^{-8}	110
10^{-9}	10

Tab.1 Die zu Abb. 3 gehörenden Werte der Eichkurve der ATP-Konzentration

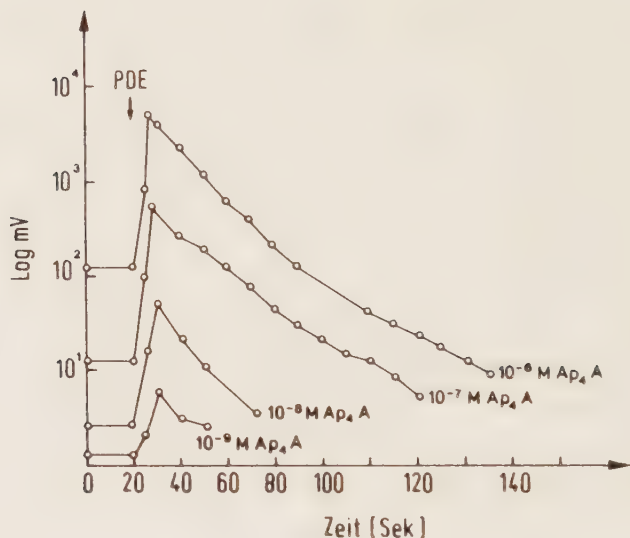


Abb. 4: Kinetik der Ap_4A -Eichkurve, Ap_4A -Bestimmung durch das Luciferin-Luciferase-System im Luminometer aus Hedl (1981).

Die Abbildung stellt den zeitlichen Ablauf der Ap_4A -Spaltung durch PDE und Luciferin-Luciferase dar. Es wurde zunächst der Background bestimmt. Durch anschließende Zugabe von PDE wurde Ap_4A quantitativ in ATP und AMP gespalten. Das entstandene ATP wurde durch das Luciferin-Luciferase-System verbraucht, was sich durch eine Zunahme an emittierten Photonen bzw. an Spannung (mV) ausdrückt. Die der Ap_4A -Konzentration (der verwendeten Lösung: 10^{-6} M , 10^{-7} M , 10^{-8} M , 10^{-9} M) entsprechende Spannung (mV) ergab sich aus der Differenz von Background und Spannungsmaximum.

Abszisse: Zeit in Sekunden

Ordinate: Logarithmus der Spannung

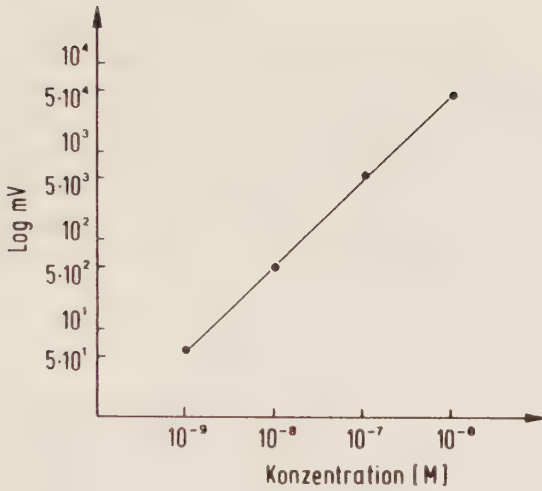


Abb. 5: Eichkurve der Ap_4A -Bestimmung mit der Luciferin-Luciferase-Methode im Luminometer.

Die Eichkurve stellt die Korrelation zwischen Ap_4A -Konzentration (M) und der entsprechenden Spannung (mV) im Luminimeter dar. Die Ap_4A -Konzentration ergibt sich aus ATP-Background (vor PDE-Zugabe) minus Spannungsmaximum (nach PDE-Zugabe).

Abszisse: Logarithmus der Spannung (mV)

Ordinate: Konzentration der Ap_4A -Lösung (M)

Konzentration	Background	Spannungs- maximum	Spannungs differenz
(M)	(mV)	(mV)	(mV)
10^{-6}	110	4.810	4.700
10^{-7}	10	570	560
10^{-8}	6	58	52
10^{-9}	2.1	7.9	5.8

Tab. 2: Die zu Abb. 5 gehörenden Werte der Eichkurve der Ap_4A -Konzentration

2.3.7. Reinigung und Aktivitätsbestimmung der Alkalischen Phosphatase

Alkalische Phosphatase diente zum Abbau des ATP-Pools im Zellnukleotidextrakt. Eine Entfernung von ATP war notwendig, da ATP die quantitative Bestimmung von Ap_4A mit dem Luciferase-Test stören würde. Alkalische Phosphatase enthielt laut Boehringer-Informationsheft 0.01 % Phosphodiesterase. Da PDE während des ATP-Abbaus auch Ap_4A spalten würde, wurde Phosphodiesterase durch Molekularsiebchromatographie an Sephadex G75 getrennt.

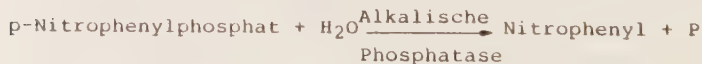
a) Chromatographie an Sephadex G75

Die Säulengröße betrug 0.7x30 cm. Sephadex G75 wurde mit dem Elutionspuffer (20 mM Tris/HCl pH 8.4, 100 mM KCl) 2 x gewaschen und in Puffer für 30 min. stehengelassen. Die Säule wurde damit gefüllt und mit ca. 30 ml Puffer äquilibriert.

Alkalische Phosphatase (in 3.2 M NH_4SO_4 , 1 mM MgCl_2 , 0.1 mM ZnCl_2) wurde abzentrifugiert, das Pellet in 0.5 ml H_2O aufgelöst und auf die Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte bei 4° C im Kühlraum. Das Fraktionsvolumen betrug 1 ml. Die erhaltenen Fraktionen wurden auf Phosphataseaktivität und auf Phosphodiesterasegehalt geprüft.

b) Bestimmung der Phosphataseaktivität

Das Prinzip der Aktivitätsbestimmung beruhte auf der Spaltung von p-Nitrophenylphosphat in Nitrophenol und Phosphat, wobei ein Farbumschlag von farblos nach gelb erfolgte:



Der Puffer für den Aktivitätstest bestand aus 0.1 M Glycin pH 10.5, 1 mM $MgCl_2$, 0.1 mM $ZnCl_2$. 750 mg Glycin wurden in destilliertem Wasser gelöst, 0.1 ml 1 M $MgCl_2$ und 0.1 ml 0.1 M $ZnCl_2$ hinzugefügt. Der pH wurde mit 1 N KOH auf ca. 10 eingestellt (pH-Optimum der Alkalischen Phosphatase). Die Nitrophenylphosphatlösung war 0.6 M.

Testansatz:

3 ml Glycin-Puffer 0.1 M Glycin pH 10.5
1 mM $MgCl_2$
0.1 mM $ZnCl_2$
30 μ l p-Nitrophenylphosphat 0.6 M
20 μ l Enzymprobe (1:10 verdünnt)

Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase wurde durch die Änderung der Extinktion pro Zeiteinheit (E/min.) im Eppendorf-Photometer bei 405 nm bestimmt. (Tab. 3, Abb. 6)

Die Umrechnung in U/ml erfolgte laut Boehringer-Informationssheft nach der Formel:

$$U/ml = \frac{3.05}{18.5 \times 1.0 \times 0.02} \times E/min$$

Endvolumen	3.05 ml
Schichtdicke	1 cm
$\epsilon_{405 \text{ nm}}$	18.5 ($cm^2/\mu mol$)

c) Untersuchung auf Phosphodiesterasegehalt

Die Kontrolle, ob Phosphodiesterase durch die Molekularsiebchromatographie an Sephadex G75 von Alkalischer Phosphatase abgetrennt und entfernt wurde, erfolgte durch Inkubation von Ap_4A mit gereinigter Alkalischer Phosphatase. Eventuell vorhandene Phosphodiesterase würde durch die Abnahme der Ap_4A -Konzentration wegen der Spaltung in ATP und AMP nachgewiesen werden.

50 μl jeder Säulenfraktion wurden mit je 1 ml 10^{-5} M Ap_4A -Lösung 24 h bei 37°C (Wasserbad) inkubiert. Vor und nach der Inkubation wurde die Ap_4A -Konzentration durch den Luciferase-Test im Luminometer bestimmt. Eine Konzentrationsabnahme gegenüber einer Vergleichslösung ohne Phosphatase zeigte Ap_4A -Abbau an. Die Phosphodiesterasefreien Fraktionen, deren Aktivität größer als 10 U/ml war, wurden verwendet und bei -20°C aufbewahrt.

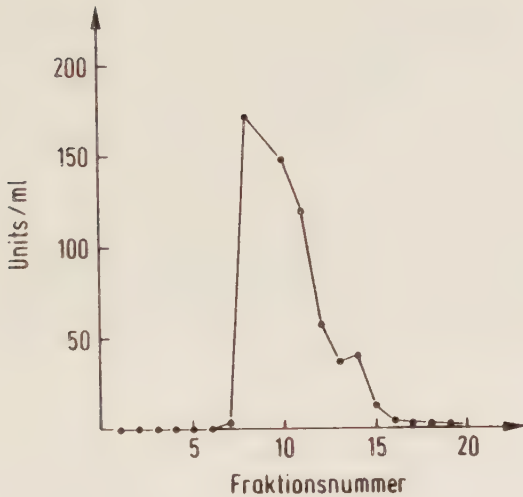


Abb. 6: Aktivitätsbestimmung der Alkalischen Phosphatase

Die Alkalische Phosphatase wurde von PDE durch Chromatographie an Sephadex G75 gereinigt. Von jeder Fraktion wurde die Aktivität (U/ml) bestimmt.

Fraktion	E/min	U/ml
1-6	-	-
7	0.26	2.1
8	21	173
9	18	148
10	14.5	120
11	6.9	57
12	4.5	37
13	4.8	40
14	1.5	12.4
15	0.4	3.3
16	0.15	1.2
17	0.2	1.6
18	0.2	1.6

Tab. 3: Die zu Abb. 6 gehörenden Werte

2.3.8. Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehaltes der Rattenleber wurde nach Lowry durchgeführt. Das Prinzip dieses Testes ist die Reduktion des Folin-Ciocalteu-Reagenzes durch die im Protein vorhandenen Phenylgruppen, wobei ein Farbumschlag von hellgelb nach blau entsteht. Die optische Intensität der blauen Farbe ist der Proteinkonzentration proportional. Die Extinktion wird bei 578 nm gemessen. Über eine Eichgerade läßt sich der Proteingehalt einer Probe bestimmen. Die Eichgerade wurde mit Rinderserum-Albumin erstellt. Die Proteinpellets der TCA-Nukleotidextraktion (siehe 2.3.2.) wurden in je 30 ml 1 N NaOH aufgelöst und 1:100 verdünnt. Die Proteingehalte der einzelnen Proben sind in Tab. 4 zusammengefaßt.

Reagenzien:

1. Reagenz A

0.5 ml 1 % $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$ -Lösung

0.5 ml 2 % Kalium-Tratrat-Lösung

50 ml 2 % Na_2CO_3 -Lösung in 1 N NaOH

Kupfersulfat- und Kaliumtartrat-Lösung wurden gemischt und langsam Natriumcarbonat-Lösung hinzugefügt.

2. Folin-Ciocalteu-Reagenz: 4:10 verdünnt

3. Rinderserum-Albumin-Lösung 0.1 mg/ml bis 1 mg/ml

4. Proteinproben: in 1 N NaOH gelöst

Testansatz:

3 ml Reagenz A

0.2 ml Probe, nach 10 min.

0.3 ml Folin-Ciocalteu-Reagenz

Nach gründlicher Durchmischung wurde die Extinktion bei 578 nm gemessen.

		Gesamtprotein (mg)
Zeit nach partieller Hepatektomie (h)	0	480
	0	570
	5	453
	10	405
	10	300
	15	360
	15	260
	20	270
	20	306
	25	270
	25	405
	30	360
	35	480
Dauer der HU-Infusion, 14 h nach p.H. (h)	15	360
	15	345
	20	465
	20	420
	25	465
	25	375
	30	255
	30	310
Dauer des freien Intervalls, nach 16h HU-Infusion, (14-30 h nach p.H.)	1	490
	1	360
	2	285
	2	225
	4	200
	4	180
	6	255
	6	231
	8	345
	8	330
	12	345
	12	165

Tab. 4: Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinpellets stammen aus der TCA-Nukleotid-extraktion. Die Verdünnung betrug 1:100, das Gesamtvolumen 30 ml.

2.3.9. Interner Standard

Der Interne Standard $^3\text{H-Ap}_4\text{A}$ wurde von Prof. Dr. F. Grummt, Universität Würzburg, synthetisiert und zur Verfügung gestellt.

Der Interne Standard wurde zu jeder Nukleotidextraktion hinzugefügt und diente dazu über den Verlust an Radioaktivität den Ap_4A -Verlust und somit die ursprüngliche (100%) Menge an Ap_4A zu berechnen.

Die eingesetzte Radioaktivität von $^3\text{H-Ap}_4\text{A}$ betrug $0,53 \mu\text{Ci}$, bzw. 700000 cpm . Die Molarität wurde luminometrisch bestimmt und betrug für die jeweils eingesetzte Menge ($2 \mu\text{l}$) $4 \times 10^{-12} \text{ M}$.

Zu Beginn jeder Nukleotidextraktion wurden $2 \mu\text{l}$ $^3\text{H-Ap}_4\text{A}$ (700000 cpm) eingesetzt. Die Bestimmung der Radioaktivität erfolgte nach der Ap_4A -Bestimmung. Der gesamte Testansatz des Luciferin-Luciferase-Testes wurde in 10 ml Bray (Szintillationscocktail für wässrige Proben) für 20 min. in einem Szintillationsmessgerät vom Typ Packard 2425 gemessen.

Die Ausbeuten betrugen $7,3 \%$ bis $72,5 \%$ (siehe Tab. 5.6).

2.3.10. Szintillationscocktail (Bray)

Zur Messung wässriger Proben wurde ein Szintillationscocktail auf Dioxan-Basis verwendet:

20 ml Äthylglykoll, 100 ml Methanol, $0,2 \text{ g}$ 1.4 Di (2-(4-methyl-5-phenyloxy)phenyl)-benzol), $0,4 \text{ g}$ 2.5 Diphenyloxazol und 60 g Naphtalin wurden mit Dioxan auf 1000 ml aufgefüllt.

Dieser Szintillationscocktail wurde zur Messung des Internen Standards verwendet.

2.3.11. Berechnung der Ap_4A -Konzentration

Die Ap_4A -Konzentration ergibt sich aus der Differenz aus Maximum der Lichtemission nach PDE-Zugabe und ATP-Background. Aus der Eichkurve läßt sich dieser Differenz, ausgedrückt in mV, die entsprechende Molarität der Ap_4A -Konzentration zuordnen.

Nach Messung der Restaktivität des gesamten Ap_4A -Assays (ausgedrückt in Prozent) kann die ursprüngliche (100 %) Ap_4A -Konzentration berechnet werden.

Die Molarität des Internen Standards $^3\text{H-Ap}_4\text{A}$ beträgt $4 \times 10^{-12} \text{ M}/2\mu\text{l}$ und beeinflußt die Ap_4A -Bestimmung nur wenig und könnte daher vernachlässigt werden, wurde aber trotzdem von der gesamten Ap_4A -Konzentration abgezogen. Die Ap_4A -Konzentration wurde auf mg Protein bezogen.

3. Ergebnisse

3.1. Ap_4A -Konzentration nach partieller Hepatektomie

Die Ap_4A -Konzentration in adulter Leber beträgt 5.9×10^{-13} Mol/mg Protein (Hedl, 1981) bzw. $0,02 \mu M$ (Weinmann-Dorsch, 1984).

Durch eine partielle Hepatektomie werden die Hepatocyten zur Zellteilung angeregt. Eine solche regenerierende Leber bildet daher ein geeignetes Zellsystem zur Untersuchung der Zellzyklusabhängigen Fluktuation des Ap_4A -Pools in vivo.

In verschiedenen Intervallen nach der Operation wurden aus den Lebern Nukleotidextrakte hergestellt und die Ap_4A -Konzentration gemessen.

Die Werte der Ap_4A -Konzentration sind in Tab. 5 zusammengefaßt und in Abb. 7 dargestellt.

Die Ap_4A -Konzentration in ruhender Leber beträgt 4.72×10^{-13} Mol Ap_4A /mg Protein. Nach partieller Hepatektomie steigt die Ap_4A -Konzentration um mehr als 1 Größenordnung an und erreicht nach 25 h ein Maximum von 7.11×10^{-12} Mol Ap_4A /mg Protein und fällt nach 35 h auf 8.40×10^{-13} Mol Ap_4A -Konzentration korreliert mit der Progression durch die G_1 -Phase des Zellzyklus, erreicht ein Maximum in der S-Phase, um nach Eintritt in die postreplikative G_2 -Phase wieder abzufallen.

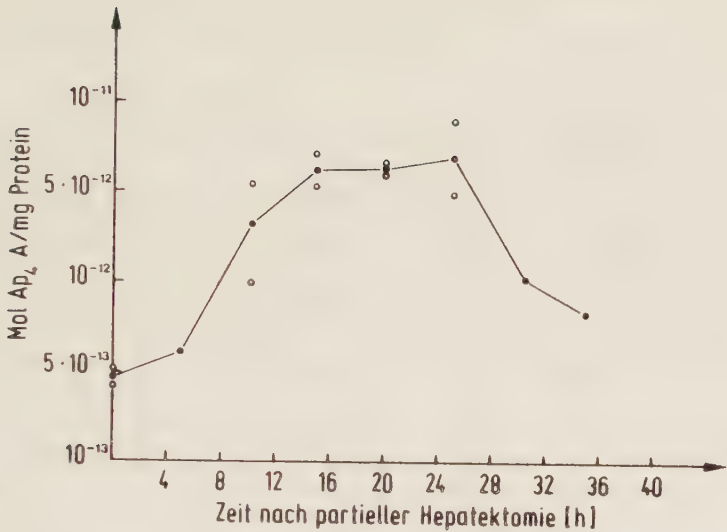


Abb.7: Verlauf der Ap₄A-Konzentration nach partieller Hepatektomie.

Nach partieller Hepatektomie wurde zu verschiedenen Zeiten (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, und 35h) aus der Leber ein Zellnukleotidextrakt hergestellt und die Ap₄A-Konzentration mit dem Luciferin - Luciferase - Test bestimmt. Ap₄A wurde auf mg Protein bezogen. Die Proteinbestimmung wurde an den Proteinpellets aus der TCA-Nukleotidextraktion durchgeführt.

Ordinate: Mol Ap₄A/mg Protein

Abszisse: Zeit in Stunden nach partieller Hepatektomie

o o Meßwerte der Doppelbestimmung

• - • - • Mittelwerte

Zeit nach p.H.	Ap ₄ A- Konzentration (Mol)	Ausbeute % Int.St.	100%Ap ₄ A-K. minus Int.St. (Mol)	Protein (mg)	Mol Ap ₄ A/ mgProtein
0	3.8x10 ⁻¹¹	18.5	2.01x10 ⁻¹⁰	480	4.19x10 ⁻¹³
0	2.5x10 ⁻¹¹	8.2	3.00x10 ⁻¹⁰	570	5.27x10 ⁻¹³
5	8.0x10 ⁻¹¹	27.2	2.90x10 ⁻¹⁰	453	6.40x10 ⁻¹³
10	1.8x10 ⁻¹⁰	42.0	4.24x10 ⁻¹⁰	405	1.04x10 ⁻¹²
10	4.4x10 ⁻¹⁰	26.3	1.66x10 ⁻⁹	300	5.56x10 ⁻¹²
15	5.0x10 ⁻¹⁰	25.3	1.97x10 ⁻⁹	360	5.47x10 ⁻¹²
15	5.6x10 ⁻¹⁰	29.7	1.88x10 ⁻⁹	260	7.23x10 ⁻¹²
20	5.8x10 ⁻¹⁰	34.8	1.66x10 ⁻⁹	270	6.15x10 ⁻¹²
20	5.2x10 ⁻¹⁰	24.9	2.08x10 ⁻⁹	306	6.81x10 ⁻¹²
25	5.5x10 ⁻¹⁰	22.2	2.47x10 ⁻⁹	270	9.16x10 ⁻¹²
25	1.5x10 ⁻¹⁰	7.3	2.05x10 ⁻⁹	405	5.06x10 ⁻¹²
30	5.6x10 ⁻¹¹	11.4	4.87x10 ⁻¹⁰	360	1.35x10 ⁻¹²
35	6.6x10 ⁻¹¹	16.2	4.03x10 ⁻¹⁰	480	8.40x10 ⁻¹³

Tab.5: Die zu Abb. 7 gehörenden Werte der Ap₄A-Konzentration nach partieller Hepatektomie

Die Leber wurden zu verschiedenen Zeiten (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 und 35 h) nach partieller Hepatektomie entnommen und Ap₄A mithilfe TCA-Extraktion, Alkalischer Phosphatase Verdau, DEAE-Chromatographie isoliert und die Konzentration mit dem Luciferin-Luciferase-Test bestimmt. Die dabei gemessene Konzentration wurde mithilfe der radioaktiven Ausbeute des Internen Standards auf die ursprüngliche (100%) Ap₄A-Konzentration umgerechnet und auf mg Protein bezogen.

Der Proteingehalt wurde mit dem Lowry-Test bestimmt. Die Molarität des Internen Standards (4×10^{-12} Mol/2 μ l) wurde abgezogen.

p.H. = partielle Hepatektomie

Int.St. = Interner Standard

K. = Konzentration

3.2. Ap₄A-Konzentration in regenerierender Leber nach HU-Synchronisation der DNS-Synthese

Die partielle Hepatektomie ist ein Wachstumsstimulus, der die Hepatocyten veranlaßt die Zellteilung zu beginnen. Die Proliferation erfolgt jedoch nur teilsynchron: die Hepatocyten treten in Abhängigkeit ihrer intralobulären Lokalisation gestaffelt in die S-Phase. Die Proliferationszone liegt zunächst in den peripheren Lobulusabschnitten und verlagert sich im weiteren Verlauf der Regeneration ins Läppchenzentrum (Rabes und Tuczek, 1970). Die Zellpopulation setzt sich somit aus ruhenden und proliferierenden Zellen zusammen.

Durch die Dauerapplikation des DNS-Synthese-Inhibitors Hydroxyharnstoff (HU) im Anschluß an eine partielle Hepatektomie werden die Hepatocyten an der G₁-Phasengrenze blockiert und akkumuliert. Nach Aufhebung des HU-Blocks treten die Hepatocyten synchron in die DNS-Synthese. Der Synchronisationsgrad beträgt 80 % (Rabes et al. 1975; Rabes et al., 1977).

Das Verhalten des Ap₄A-Pools während und nach der HU-Infusion wurde untersucht. Die HU-Infusion begann 14 h nach partieller Hepatektomie. Für die Tiere der Gruppe 1 betrug die Dauer der HU-Infusion 1, 6, 11 und 16 h. Für die Tiere der Gruppe 2 betrug die Infusionsdauer 16 h. Diese Tiere wurden zu verschiedenen Zeiten nach Ende der HU-Infusion (1, 2, 4, 6, 8 und 12 h) getötet. Ap₄A wurde durch TCA-Nukleotidextraktion, Alkalische Phosphatase Verdau und DEAE-Chromatographie isoliert und die Ap₄A-Konzentration mit dem Luciferin-Luciferase-Test bestimmt. Die Werte der Ap₄A-Konzentration sind in Tab. 6 zusammengefaßt und in Abb. 8 dargestellt.

Die Ap_4A -Konzentration liegt 15 h nach partieller Hepatektomie und nach 1-stündiger HU-Infusion bei 5.42×10^{-12} Mol $\text{Ap}_4\text{A}/\text{mg}$ Protein. Diese Ap_4A -Konzentration liegt damit in der gleichen Größenordnung wie die Ap_4A -Konzentration 15 h nach partieller Hepatektomie ohne HU-Infusion. Diese Werte deuten den Aufbau des Ap_4A -Pools an.

Im Laufe der 16-stündigen HU-Infusion wird die DNS-Synthese blockiert und die Zellen in G_1 arretiert. Die Ap_4A -Konzentration sinkt in dieser Phase auf 2.66×10^{-12} Mol $\text{Ap}_4\text{A}/\text{mg}$ Protein ab.

Nach Aufhebung des HU-Blocks steigt die Ap_4A -Konzentration innerhalb von 4 h auf 7.48×10^{-12} Mol $\text{Ap}_4\text{A}/\text{mg}$ Protein an und fällt nach 6 h auf 1.43×10^{-12} Mol $\text{Ap}_4\text{A}/\text{mg}$ Protein ab.

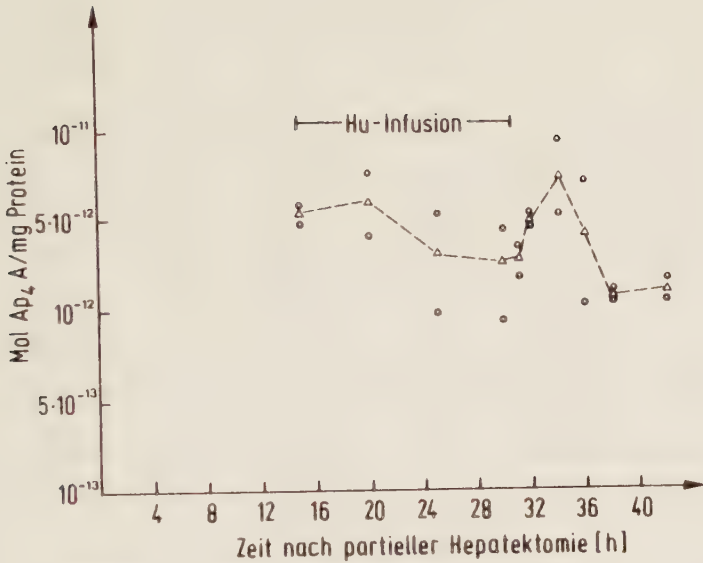


Abb. 8: Verlauf der Ap₄A-Konzentration in regenerierender Leber nach Synchronisation der DNS-Synthese mit HU

Die HU-Infusion begann 14 h nach partieller Hepatektomie und dauerte für die Tiere der Gruppe 1 1, 6, 11 und 16 h. Für die Gruppe 2 dauerte die HU-Infusion 16 h. Die Tiere wurden 1, 2, 4, 6, 8 und 12 h nach Ende der HU-Infusion getötet. Ap₄A wurde auf mg Protein bezogen. Die Proteinbestimmung wurde an den Proteinpellets aus der TCA-Nukleotidextraktion durchgeführt.

Ordinate: MolAp₄A/mg Protein

Abszisse: Zeit in Stunden nach partieller Hepatektomie

○ ○ Meßwerte der Doppelbestimmung

△-△-△ Mittelwerte

Zeit nach p.H.	Ap ₄ A- Konzentration (Mol)	Ausbeute % Int.St.	100% Ap ₄ A-K.. minus Int.St. (Mol)	Protein (mg)	Mol Ap ₄ A/ mg Protein
Gr. 1					
15	8.1x10 ⁻¹⁰	45.9	1.76x10 ⁻⁹	360	4.89x10 ⁻¹²
15	6.6x10 ⁻¹⁰	32.0	2.05x10 ⁻⁹	345	5.96x10 ⁻¹²
20	8.9x10 ⁻¹⁰	24.3	3.65x10 ⁻⁹	465	7.86x10 ⁻¹²
20	5.6x10 ⁻¹⁰	32.1	1.74x10 ⁻⁹	420	4.14x10 ⁻¹²
25	3.4x10 ⁻¹⁰	72.5	4.64x10 ⁻¹⁰	465	9.90x10 ⁻¹³
25	6.2x10 ⁻¹⁰	30.8	2.00x10 ⁻⁹	375	5.36x10 ⁻¹²
30	4.1x10 ⁻¹⁰	36.5	1.11x10 ⁻⁹	255	4.38x10 ⁻¹²
30	1.2x10 ⁻¹⁰	39.8	2.97x10 ⁻¹⁰	310	9.59x10 ⁻¹³
Gr. 2					
31	3.9x10 ⁻¹⁰	41.1	9.44x10 ⁻¹⁰	490	1.92x10 ⁻¹²
31	4.7x10 ⁻¹⁰	36.7	1.27x10 ⁻⁹	360	3.54x10 ⁻¹²
32	4.8x10 ⁻¹⁰	30.9	1.54x10 ⁻⁹	285	5.43x10 ⁻¹²
32	3.8x10 ⁻¹⁰	35.4	1.06x10 ⁻⁹	225	4.75x10 ⁻¹²
34	4.8x10 ⁻¹⁰	44.3	1.07x10 ⁻⁹	200	5.39x10 ⁻¹²
34	3.2x10 ⁻¹⁰	18.5	1.72x10 ⁻⁹	180	9.58x10 ⁻¹²
36	6.2x10 ⁻¹⁰	33.7	1.83x10 ⁻⁹	255	7.19x10 ⁻¹²
36	5.6x10 ⁻¹¹	20.8	2.65x10 ⁻¹⁰	230	1.15x10 ⁻¹²
38	6.8x10 ⁻¹¹	12.6	5.35x10 ⁻¹⁰	345	1.55x10 ⁻¹²
38	8.2x10 ⁻¹¹	17.6	4.61x10 ⁻¹⁰	330	1.39x10 ⁻¹²
42	7.2x10 ⁻¹¹	19.7	3.61x10 ⁻¹⁰	345	1.04x10 ⁻¹²
42	5.2x10 ⁻¹¹	17.3	2.96x10 ⁻¹⁰	162	1.83x10 ⁻¹²

Tab.6. Die zu Abb. 8 gehörenden Werte der Ap₄A Konzentration in regenerierender Leber nach HU-Synchronisation der DNS-Synthese.

Die HU-Infusion begann 14h nach partieller Hepatektomie.

Gr.1 = Gruppe 1: 1-, 6-, 11-, 16-stündige HU-Infusion.

Gr.2 = Gruppe 2: 16-stündige HU-Infusion, anschließend Intervall (1, 2, 4, 6, 8, 12h)

Ap₄A wurde mithilfe TCA-Extraktion, alkalische Phosphatase Verdau, DEAE-Chromatographie isoliert und die Konzentration mit dem Luciferin-Luciferase-Test bestimmt. Diese Konzentration wurde aufgrund der Ausbeute des Internen Standards auf die 100%ige Ap₄A-Konzentration umgerechnet und auf mg Protein bezogen. Die Molarität des Internen Standards (4x10⁻¹² Mol/2μl) wurde abgezogen.

p.H. = partielle Hepatektomie;

Int.St. = Interner Standard;

K. = Konzentration

3.3. Vergleich der Ap_4A -Konzentration in regenerierender Leber nach partieller Hepatektomie und nach HU-Synchronisation der DNS-Synthese

Wie aus Abb. 9 ersichtlich liegt zu Beginn der HU-Infusion (14 h nach partieller Hepatektomie) die mittlere Ap_4A -Konzentration mit 5.42×10^{-12} Mol Ap_4A /mg Protein im gleichen Bereich wie nach partieller Hepatektomie ohne zusätzliche HU-Gabe (6.35×10^{-12} Mol Ap_4A /mg Protein). Mit zunehmender Dauer der HU-Infusion nimmt die Ap_4A -Konzentration ab.

Nach 11-stündiger Infusion ist der Ap_4A -Pool auf 3.17×10^{-12} Mol Ap_4A /mg Protein abgesunken, während der entsprechende Wert 25 h nach partieller Hepatektomie bei 7.11×10^{-12} Mol Ap_4A /mg Protein liegt. Im weiteren Verlauf der HU-Infusion bleibt die Ap_4A -Konzentration unverändert, während die Ap_4A -Konzentration 35 h nach Teilektomie auf 8.40×10^{-13} Mol Ap_4A /mg Protein abgesunken ist.

Nach Beendigung der 16-stündigen HU-Infusion, d.h. nach Aufhebung des DNS-Synthese-Blocks steigt die Ap_4A -Konzentration innerhalb von 4 h auf 7.48×10^{-12} Mol Ap_4A /mg Protein an, das in der Größenordnung dem Maximum nach partieller Hepatektomie entspricht. Danach fällt der Ap_4A -Pool auf einen mittleren Bereich von 1.43×10^{-12} Mol Ap_4A /mg Protein ab, und liegt somit geringgradig höher als der 35 h-Wert nach Teilektomie (8.40×10^{-13} Mol Ap_4A /mg Protein).

Die Werte dieser Ap_4A -Kontrationen sind in Tab. 7 zusammengefaßt und in Abb. 9 dargestellt.

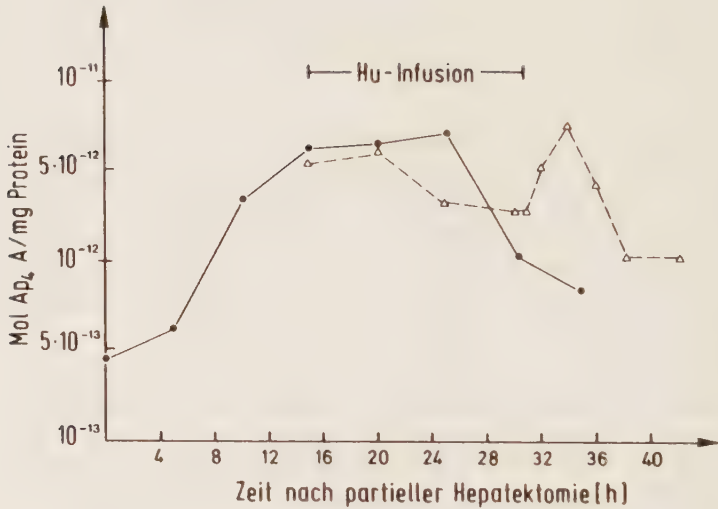


Abb.9: Vergleich der Mittelwerte der Ap₄A-Konzentration in regenerierender Leber nach partieller Hepatektomie und während und nach einer HU-Infusion.

Die HU-Infusion begann 14 h nach partieller Hepatektomie und dauerte 16 h. Die Ap₄A-Konzentration wurde vor, während und nach der HU-Infusion mit dem Luciferin-Luciferase-Test bestimmt und auf mg Protein bezogen.

Ordinate: Mol Ap₄A/mg Protein

Abszisse: Zeit in Stunden nach partieller Hepatektomie

● — ● — ● Mittelwerte der Ap₄A-Konzentration nach partieller Hepatektomie

△ — △ — △ Mittelwerte der Ap₄A-Konzentration während und nach HU-Infusion

	Zeit nach p.H.	Mittelwert Mol Ap_4A /mg Protein
Partielle Hepatektomie	0	4.72×10^{-13}
	5	6.40×10^{-13}
	10	3.30×10^{-12}
	15	6.35×10^{-12}
	20	6.48×10^{-12}
	25	7.11×10^{-12}
	30	1.35×10^{-12}
	35	8.40×10^{-13}
HU-Infusion	15	5.42×10^{-12}
	20	6.01×10^{-12}
	25	3.17×10^{-12}
	30	2.66×10^{-12}
	31	2.73×10^{-12}
	32	5.09×10^{-12}
	34	7.48×10^{-12}
	36	4.17×10^{-12}
	38	1.47×10^{-12}
	42	1.43×10^{-12}

Tab. 7: Die zu Abb. 9 gehörenden Werte der Ap_4A -Konzentrationen in regenerierender Leber nach partieller Hepatektomie und nach HU-Synchronisation der DNS-Synthese.

Die Mittelwerte wurden berechnet aus den Doppelbestimmungen aus Tab. 5 und Tab. 6.

4. Diskussion

Aus Untersuchungen zur Proliferationskontrolle hat sich ergeben, daß Diadenosintetraphosphat (Ap_4A), bei der Initiation der DNS-Replikation eine Rolle spielen könnte.

Die Fluktuation des Ap_4A -Pools in Abhängigkeit des Proliferationszustandes (Rapaport und Zamecnik, 1976; Weinmann-Dorsch, 1981; Ogilvie, 1981; Weinmann-Dorsch, 1984) und die Stimulation der DNS-Synthese durch Ap_4A -Zugabe (F. Grummt, 1979) liessen Ap_4A als das Signalmolekül der DNS-Synthese erscheinen.

Weitere Hinweise für die Funktion von Ap_4A als Trigger der DNS-Replikation war die Bindungsfähigkeit von Ap_4A an eine Untereinheit ($M_r=57000$) der Kalbsthymus-DNS-Polymerase (Grummt et al., 1979) und an die DNS-Polymerase aus humanen HeLa-Zellen (Rapaport et al., 1981), sowie die Involvierung von Ap_4A als Primer der DNS-Synthese (Rapaport et al., 1981; Zamecnik et al., 1982).

Mit der Luciferin-Luciferase-Methode, die auf der Spaltung Ap_4A durch die Phosphodiesterase in ATP und AMP und anschließender quantitativer Messung von ATP mit dem Luciferin-Luciferase-System beruht (Hedl, 1981), konnte Ap_4A in verschiedenen Wachstums-, Transformations- und Differenzierungszuständen gemessen werden (Hedl, 1981; Weinmann-Dorsch, 1981; Weinmann-Dorsch et al., 1984).

Dabei zeigt sich eine strikte Korrelation der Ap_4A -Konzentration mit dem Proliferationszustand. So betrug die Ap_4A -Konzentration in ruhenden Zellen 10^{-8} (M) und in proliferierenden Zellen 10^{-6} (M).

Diese Experimente wurden bisher nahezu ausnahmslos an Zellkulturen durchgeführt. Von großer Bedeutung ist die Frage, ob Ap_4A als Signal der DNS-Synthese auch in vivo eine Rolle spielt.

Zur Klärung dieser Frage bietet sich als in vivo-System regenerierende Leber der Ratte an. Es konnte gezeigt werden, daß die Ap_4A -Konzentration nach partieller Hepatektomie, die wie die Serumzugabe in Zellkulturen in vitro als Wachstumsstimulus zu verstehen ist, um mehr als 1 Größenordnung zunimmt. Die Ap_4A -Konzentration beträgt in ruhender Leber 4.72×10^{-13} Mol $\text{Ap}_4\text{A}/\text{mg}$ Protein. Nach partieller Hepatektomie steigt die Ap_4A -Konzentration an, erreicht nach 25 h ein Maximum von 7.11×10^{-12} Mol $\text{Ap}_4\text{A}/\text{mg}$ Protein und fällt nach 35 h auf 8.40×10^{-13} Mol $\text{Ap}_4\text{A}/\text{mg}$ Protein ab.

Die Ap_4A -Konzentration steigt also mit Dauer der G_1 -Phase an, erreicht ein Maximum in der S-Phase und fällt in der postreplikativen G_2 -Phase ab.

Damit scheint sich die Korrelation zwischen Fluktuation der Ap_4A -Konzentration und dem Verlauf der DNS-Synthese zu bestätigen.

Der Eintritt in die S-Phase nach partieller Hepatektomie erfolgt jedoch nicht synchron, sondern ist abhängig von der intralobulären Lokalisation. Hepatocyten nahe des afferenten Poles synthetisieren als erste DNS, gefolgt von den intermediär und perivenös liegenden Zellen (Rabes und Tuczek, 1970; Rabes, 1977).

Der für die Ap_4A -Messung zur Verfügung stehende Zellpool ist somit heterogen und besteht aus ruhenden und proliferierenden Zellen, die wie bereits beschrieben, unterschiedliche Ap_4A -Konzentrationen enthalten könnten also Durchschnittswerte von Zellen hoher und niedriger Ap_4A -Konzentration zu verstehen sein.

Tatsächlich ist auch die Ap_4A -Konzentrationszunahme in der S-Phase weniger als 2 Größenordnungen niedriger als in 3T3- oder BHK-Zellen mit einer Zunahme von 3 Größenordnungen (Weinmann-Dorsch, 1981; Weinmann-Dorsch et al., 1984).

Eine im Zellzyklus-Transit vereinheitlichte Zellpopulation läßt sich mit Hydroxyharnstoff (HU) gewinnen. HU hemmt reversibel die DNS-Synthese durch Inaktivierung der Ribonukleosid-Diphosphat-Reduktase (Krakoff et al., 1968) und akkumuliert dadurch die Hepatocyten an der G₁-S-Grenze. Nach Aufhebung des Blocks treten die Hepatocyten synchronisiert in die S-Phase ein.

Die Ap₄A-Konzentration beträgt in der ersten Stunde der HU-Infusion (15 h nach partieller Hepatektomie) 5.42×10^{-12} Mol Ap₄A/mg Protein. Nach 16-stündiger HU-Infusion sinkt die Ap₄A-Konzentration auf 3.17×10^{-12} Mol Ap₄A/mg Protein. Nach Beendigung der HU-Infusion steigt die Ap₄A-Konzentration innerhalb von 4 h auf ein Maximum von 7.48×10^{-12} Mol Ap₄A/mg Protein an und fällt innerhalb von 4 h auf 1.43×10^{-12} Mol Ap₄A/mg Protein ab.

Aus diesen Ergebnissen, dargestellt in Tab. 5, 6, 7 und Abb. 7, 8, 9, ist zu ersehen, daß die Ap₄A-Konzentrationen zu Beginn der HU-Infusion (15 h nach partieller Hepatektomie) und ohne HU-Infusion (15 h nach partieller Hepatektomie) in der gleichen Größenordnung liegen (5.42×10^{-12} bzw. 6.35×10^{-12} Mol Ap₄A/mg Protein). Dies spricht dafür, daß sich die Hepatocyten im gleichen proliferativen Zustand befinden.

Während der HU-Infusion wird die DNS-Synthese blockiert (Krakoff et al., 1968) und die Zellen befinden sich in einem nicht-proliferativen, ruhenden Zustand. Entsprechend bisheriger Messungen der Ap₄A-Fluktuation in Abhängigkeit des Proliferationszustandes, wäre ein Abfall der Ap₄A-Konzentration auf Werte zu erwarten, die denen der ruhender Zellen entsprechen. Die Ap₄A-Konzentration fällt auch tatsächlich mit zunehmender Dauer der HU-Infusion, d.h. Hemmung der DNS-Synthese, auf 3.17×10^{-12} Mol Ap₄A/mg Protein an. Diese Ap₄A-Konzentration liegt jedoch etwas höher als die in ruhender Leber (4.72×10^{-13} Mol Ap₄A/mg Protein, Nullwert der partiellen Hepatektomie). Somit liegt die Ap₄A-Konzentration auf einem relativ hohen Niveau.

Nach Beendigung der HU-Infusion wird der DNS-Synthese-Block aufgehoben und die DNS-Synthese initiiert (Rabes et al., 1977). Die Ap_4A -Konzentration steigt in Korrelation zur DNS-Synthese auf ein Maximum an (7.48×10^{-12} Mol Ap_4A /mg Protein) und liegt damit in der gleichen Größenordnung wie das Maximum der partiellen Hepatektomie (7.11×10^{-12} Mol Ap_4A /mg Protein).

Es muß dabei berücksichtigt werden, daß die Anzahl der Hepatocyten, die nach Ende der HU-Infusion in die S-Phase eintreten etwa 80 % beträgt, während die Anzahl DNS-synthetisierender Hepatocyten nach partieller Hepatektomie etwa 30 % beträgt. Daher wäre nach Aufhebung des HU-Blocks wegen der größeren Anzahl DNS-synthetisierender Hepatocyten ein höheres Maximum zu erwarten, wenn eine direkte Proportionalität zwischen intrazellulärem Ap_4A -Spiegel und DNS-Synthese gegeben wäre. Die Maxima der Ap_4A -Konzentrationen liegen trotz unterschiedlicher S-Phasen-Fraktion in der gleichen Größenordnung.

Diese Maxima werden unterschiedlich schnell erreicht. Nach partieller Hepatektomie benötigen die Hepatocyten 25 h, während nach Beendigung der HU-Infusion das Maximum innerhalb von 4 h erreicht wird. Die Ursache liegt wahrscheinlich darin, daß die Hepatocyten durch HU am Ende der G_1 -Phase arretiert werden, somit die G_1 -Phase bereits durchlaufen haben und nach Aufhebung des DNS-Synthese-Blocks direkt in die S-Phase eintreten können. Nach einfacher partieller Hepatektomie dagegen müssen die Hepatocyten erst die G_1 -Phase durchlaufen und benötigen somit mehr Zeit.

Nach Erreichen des Maximums fällt die Ap_4A -Konzentration innerhalb von 4 h ab und bleibt dann konstant. Diese Ap_4A -Konzentration (1.47×10^{-12} Mol Ap_4A /mg Protein) liegt in der gleichen Größenordnung wie bei einfacher partieller Hepatektomie, 10 h nach Erreichen des Maximums (8.40×10^{-13} Mol Ap_4A /mg Protein. Dieser Zeitpunkt entspricht dem Ende der S-Phase.

Es müssen auch die Abweichungen der Ap_4A -Konzentrationen der Doppelbestimmungen beachtet werden. So weichen die 25, 30, 34 und 36 h-Werte (11- und 16-stündige HU-Infusion, und 4- und 6-stündiges Intervall nach 16 h Infusion) um ca. 5×10^{-12} Mol Ap_4A /mg Protein (Faktor 5) auseinander.

Die Ursache liegt möglicherweise in der unterschiedlichen Ausbeute des Internen Standards $^3\text{H-Ap}_4\text{A}$. Die Ausbeute für die oben genannten Werte liegt zwischen 18,5 % und 72,5 % (siehe Tab. 6). Anhand der gemessenen Ausbeute des Internen Standards (in Prozent) wird auf die ursprüngliche (100%ige) Ap_4A -Konzentration zurückgerechnet. Dabei ist die Berechnung um so genauer je größer die Ausbeute ist, und umgekehrt. Daher könnten verschieden hohe Ausbeuten zu einer Divergenz der berechneten Ap_4A -Konzentrationen führen.

Die Ausbeute des 25 h-Wertes (11 h HU-Infusion) bei 9.9×10^{-13} Mol Ap_4A /mg Protein (72,5 % Ausbeute) und bei 5.35×10^{-12} Mol Ap_4A /mg Protein (30,8 % Ausbeute). Der um ca. 5×10^{-12} höhere Wert könnte durch die Umrechnung der relativ niederen Ausbeute auf die 100%ige Ap_4A -Konzentration entstanden sein.

Das gleiche gilt für den 34 h-Wert (4-stündiges Intervall nach 16 h HU-Infusion).

Dies trifft jedoch nicht zu für den 30 h-Wert (16 h HU-Infusion) und für den 36 h-Wert (6 h Intervall nach 16 h HU-Infusion). Die Ap_4A -Konzentration und Ausbeute des 30 h-Wertes liegt bei 4.38×10^{-12} Mol Ap_4A /mg Protein (36,5 % Ausbeute) und bei 9.59×10^{-13} Mol Ap_4A /mg Protein (39,8 % Ausbeute). Die Ausbeuten liegen somit in der gleichen Größenordnung und trotzdem weichen die Ap_4A -Konzentrationen um 5×10^{-12} auseinander.

Ebenso weichen die Ap_4A -Konzentrationen des 36 h-Wertes auseinander. Die Ap_4A -Konzentration beträgt 7.19×10^{-12} Mol Ap_4A /mg Protein (33,7 % Ausbeute) und 1.15×10^{-12} Mol Ap_4A /mg Protein (20,8 % Ausbeute). Die Ursache für diese streuenden 30- und 36 h-Werte konnten nicht eruiert werden.

Eine Methode zur Verbesserung der Ausbeute ließe sich dadurch erreichen, daß die Zellnukleotide statt mit Trichloressigsäure (TCA) mit Ameisensäure extrahiert werden, da Ameisensäure, im Gegensatz zu TCA, bei der anschließenden Lyophilisation flüchtig ist, und so ein verlustreicher Reinigungsschritt, nämlich Entfernung von TCA durch Ausschütteln mit Äther, entfällt. Diese Methode ist für Zellkulturen geeignet (Weinmann-Dorsch, 1981; Weinmann-Dorsch et al., 1984), ließ sich jedoch auf Leber nicht anwenden.

Zur Klärung des relativ hohen Ap_4A -Pools während der HU-Infusion (DNS-Synthese-Hemmung), der streuenden Werte der Ap_4A -Konzentrationen nach Ende der HU-Infusion (DNS-Synthese) und des relativ niederen Maximums nach Beendigung der HU-Infusion (DNS-Synthese) könnte eine Interferenz von HU und der Ap_4A -Bestimmung in Erwägung gezogen werden. HU sublimiert als flüchtige Substanz bei der Lyophilisation und dürfte eigentlich keinen Einfluß auf die Ap_4A -Bestimmung haben.

Diese vorliegenden Ergebnisse stützen die Hypothese, daß Ap_4A an der mitogenen Induktion beteiligt ist. Damit liesse sich darüber spekulieren, welcher intrazelluläre Mechanismus der Umsetzung der Kontrollfaktoren der Leberregeneration in die Stimulation der DNS-Synthese zugrunde liegt. Kontrollfaktoren der Regeneration, wie EGF, Insulin und Glucagon, wie sie von Leffert (1982) und Verly (1976) beschrieben wurden, könnten mit Rezeptoren der Zellmembran in Wechselwirkung treten und Signale auslösen, die eine intrazelluläre Zunahme des Ap_4A -Pools hervorrufen. Diese erhöhte Ap_4A -Konzentration könnte anschließend, wahrscheinlich durch Bindung an die DNS-Polymerase den Replikationsmechanismus triggern. Auf diese Weise könnte die mitogene Induktion in eine zelluläre Antwort, nämlich den Beginn der DNS-Synthese, übersetzt werden.

5. Zusammenfassung

Mit der Luciferin-Luciferase-Methode lassen sich Ap_4A -Pools in vivo in der Rattenleber bestimmen. Die Ap_4A -Konzentration beträgt in normaler Leber 4.72×10^{-13} Mol $\text{Ap}_4\text{A}/\text{mg}$ Protein.

Nach partieller Hepatektomie steigt die Ap_4A -Konzentration an und erreicht nach 25 h ein Maximum von 7.11×10^{-12}

Mol $\text{Ap}_4\text{A}/\text{mg}$ Protein und fällt nach 35 h nach Teilektomie auf 8.40×10^{-13} Mol $\text{Ap}_4\text{A}/\text{mg}$ Protein ab. Die Ap_4A -Fluktuation scheint mit dem Proliferationszustand der Zellen zu korrelieren.

Die Ap_4A -Konzentration in regenerierender Leber nach Synchronisation der DNS-Synthese durch Dauerinfusion von Hydroxyharnstoff beträgt am Anfang der Infusion, 15 h nach partieller Hepatektomie 5.42×10^{-12} Mol $\text{Ap}_4\text{A}/\text{mg}$ Protein und am Ende der Infusion 2.66×10^{-12} Mol $\text{Ap}_4\text{A}/\text{mg}$ Protein und entspricht damit wahrscheinlich dem allmählichen Aufbau des Ap_4A -Pools an der G_1 -S-Grenze.

Nach Aufhebung des Hydroxyharnstoff-Blocks treten die Hepatocyten mit einem erhöhten Grad an Synchronie in die S-Phase ein. In Korrelation hierzu nimmt die Ap_4A -Konzentration zu und erreicht nach 4 h ein Maximum von 7.48×10^{-12} Mol $\text{Ap}_4\text{A}/\text{mg}$ Protein und fällt innerhalb von 2 h auf 1.47×10^{-12} Mol $\text{Ap}_4\text{A}/\text{mg}$ Protein ab. Dieser Zeitpunkt entspricht dem Ende der S-Phase.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß Ap_4A , das in Zellkulturen als intrazelluläres Signal der Proliferationskontrolle und Trigger der DNS-Replikation angesehen wird, auch in vivo eine Rolle bei der Initiation der DNS-Synthese spielt.

6. Literatur

- Das, M. (1981) Initiation of nuclear DNA replication: Evidence for formation of committed prereplicative cellular state. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 5677-5681
- Graham, C.F., K. Arms & Gurdon, J.B. (1966) Induction of DNA-Synthesis by Frogg Egg Cytoplasm. Dev. Biol. 14, 349-381
- Grummt, I. & Grummt, F. (1976) Control of Nucleolar RNA Synthesis by the intracellular Pool Size of ATP and GTP. Cell 7, 447-453
- Grummt, I., Smith, K.A. & Grummt, F. (1976) Amino Acid Starvation Affects the Initiation Frequency of Nucleolar RNA Polymerase. Cell 7, 439-445
- Grummt, F., Paul, D. & Grummt, I. (1977) Regulation of ATP-Pool, rRNA and DNA Synthesis in 3T3 Cells in Response to Serum or Hypoxanthine. Eur. J. Biochem. 76, 7-12
- Grummt, F. (1978) Diadenosine 5', 5'''-p¹, p⁴-tetraphosphate triggers initiation of in vitro DNA replication in baby hamster kidney cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 371-375
- Grummt, F. (1979) Diadenosinetetraphosphate Triggers in vitro DNA Replication. Cold Spring Harbour Symposium on Quantitative Biology 43, 649-653
- Grummt, F., Walth, G., Jantzen, H.-M. & Hamprecht, K. (1979) Diadenosine 5', 5'''-p¹, p⁴-tetraphosphate, a ligand of the 57-Kilodalton subunit of DNA Polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 6081-6085
- Hedl, A. (1981) Ausarbeitung und Anwendung einer neuen Methode zum quantitativen Nachweis von Diadenosine-5', 5''', p¹, p⁴-tetraphosphat (Ap₄A). Diplomarbeit, MPI für Biochemie, Martinsried bei München
- Higgins, G.M. & Anderson, R.M. (1931) Experimental Pathology of the Liver; Restoration of the White Rat following Partiel Surgical Removal. Arch. Path. 12, 186-202
- Johnson, R.T. & Harris, H. (1969) DNA Synthesis and Mitosis in Fused Cells. J.Cell. Sci. 5, 625-644

- Krakoff, I.H., Brown, N.C. & Reichard, P. (1968) Inhibition of Ribonucleoside Diphosphate Reductase by Hydroxyurea. *Canc. Res.* 28, 1559-1565
- Leffert, H.L., Koch, K.S., Lad, P.J. Skelly, H. & Hemptime, B. (1982) The Liver: Biology and Pathobiology 601-614
- Luca de, M. & McElroy, W.D. (1978) Purification and Properties of the Firefly Luciferase.
- Lundin, A. & Thore, A. (1975) Analytical Information Obtainable by Evaluation of the Time Course of Firefly Bioluminescence in the Assay of ATP. *Anal. Biochem.* 66, 47-63
- Lundin, A., Richardsson, A. & Thore, A. (1976) Continuous Monitoring of ATP-Converting Reactions by Purified Firefly Luciferase. *Anal. Biochem.* 75, 611-620
- Lundin, A., Thore, A. & Baltscheffsky, M. (1977) Sensitive Measurement of the Flash induced Photophosphorylation in Bacterial Chromatophores by Firefly Luciferase
- Meuth, M., Aufreiter, E. & Reichard, R. (1976) Deoxyribonucleotide Pools in Mouse Fibroblast Cell Lines with Altered Ribonucleotide Reductase
- Ogilvie, A. (1981) Determination of Diadenosine Tetraphosphate (Ap₄A) levels in subpicomole Quantities by a Phosphodiesterase Luciferin-Luciferase Coupled Assay: Application as a Specific Assay for Diadenosine Tetraphosphatase. *Anal. Biochem.* 115, 302-307
- Pastan, I.H., Johnson, G.S. & Anderson, W.B. (1975) Role of cyclic nucleotide in growth control. *Ann Rev. Biochem.* 44, 491-522
- Pfeiffer, S.E. & Tolmach, L.J. (1967) Inhibition of DNA Synthesis in HeLa Cells by Hydroxyurea, *Canc. Res.* 27, 124-129
- Philips, F.S., Sternberg, S.S., Schwartz, H.S., Cronon, A.P., Sodergren, J.E. & Vidal, P.M. (1967) Hydroxyurea I. Acute Cell Death in Proliferating Tissue in Rats. *Canc. Res.* 27, 61-74

- Rabes, H. & Tuczek, H.V. (1970) Quantitative autoradiographische Untersuchung zur Hetrogenität der Leberzellproliferation nach partieller Hepatektomie. Virchows Arch. Abt. B Zellpath. 6, 302-312
- Rabes, H., Iseler, G., Czichos, S. & Tuczek, H.V. (1975) Induzierte Synchronie von Zellzyklusphasen in regenerierender Rattenleber. Verh.Dtsch.Ges. Path. 59, 459
- Rabes, H.M., Iseler, G., Czicos, S. & Tuczek, H.V. (1977) Synchronization of Hepatocellular DNA Synthesis in Regenerating Rat Liver by Continous Infusion of Hydroxyurea. Canc. Res. 37, 1105-1111
- Rabes, H.M. (1977) Kinetics of hepatocellular Proliferation as a function of the microvascular structure and functional state of the liver. Ciba Foundation Symposium 55: Hepatotrophic Facotrs, 31-53
- Randerarth, K., Janewany, C.M., Stephenson, M.L. & Zamecnik, P.C. (1966) Encymatic Synthesis of Diadenosine Tetraphosphate and Diadenosine Triphosphate with a purified Lysyl-sRNA Synthetase. Biochem. Biophys. Res. Comm. 42, 98-105
- Rao, P.N. & Johnson, R.T. (1970) Mammalian Cell Fusion: Studies on the Regulation of the DNA Synthesis and Mitosis, Nature 225, 159-164
- Rao, P.N. Sunkara, P.S. & Wilson, B.A. (1977) Regulation of DNA Synthesis: Age-dependent cooperation among G₁ cells upon fusion. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 2869-2873
- Rao, P.N., Wilson, B.A. & Sunkara, P.S. (1978) Inducers of DNA Synthesis present during mitosis of mammalian cells lacking G₁ and G₂ phases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 5043-5047
- Rapaport, E. & Zamecnik, P.C. (1976) Presence of Diadenosine 5', 5'''-p¹, P⁴-tetraphosphate (Ap₄A) in mammalian cells in levels varying widely with proliferative activity of the tissue: A possible "pleiotypic" activator, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73. 3984-3988

- Rapaport, E., Zamecnik, P.C. & Baril, E.F. (1981) HeLa cell polymerase α is tightly associated with tryptophanyl-tRNA synthetase and diadenosine 5', 5'''-p¹, p⁴-tetrphosphate binding activities. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 838-842
- Rapaport, E., Zamecnik, P.C. & Baril, E.F. (1981) Association of Diadenosine 5', 5'''-p¹, p⁴-tetrphosphate Binding protein with HeLa Cell DNA Polymerase. J. Biol. Chem. 256, 12148-12151
- Scott, J.F. & Zamecnik, P.C. (1969) Some optical properties Diadenosine-5'-Phosphates. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 64, 1308-1314
- Schwarz, H.S., Garofalo, M., Sternberg, S.S., & Philips, F.S. (1965) Hydroxyurea: Inhibition of Deoxyribonucleic Acid Synthesis in Regenerating Liver of Rats. Canc. Res. 25, 1868-1871
- Sinclair, W.K. (1967) Hydroxyurea: Effects on Chinese Hamster Cells Grown in Culture. Canc. Res. 27, 297-308
- Skoog, K.L., & Nordenskjöld, B. (1971) Effects of Hydroxyurea and 1- β -D-Arabinofuranosylcytosine on Deoxyribonucleotide Pools in Embryo Cells. Eur. J. Biochem. 19, 81-89
- Skoog, K.L., Nordenskjöld, B.A. & Bjursell, K.G. (1973) Deoxyribonucleoside-Triphosphate Pools and DNA Synthesis in Synchronized Hamster Cells. Eur. J. Biochem. 33, 428-432
- Verly, W.G. (1976) The control of the liver growth in J.C. Houk: Chalmers, 401-425
- Weinmann-Dorsch, Ch. (1981) Bestimmung von Ap₄A-Pools in eukaryontischen Zellen verschiedenen Wachstumszustandes
- Weinmann-Dorsch, Ch., Hedl, A., Grummt, I., Albert, W., Ferdinand, F.F., Friis, R.R., Pierron, G., Moll, W. & Grummt F. (1984) Drastic rise of intracellular adenosine (5') tetraphospho (5') adenosine correlates with the onset of DNA synthesis in eukaryotic cells. Eur. J. Biochem. 138, 179-185

- Young, Ch.W. & Hodas, S. (1964) Hydroxyurea: Inhibitory Effects on DNA Metabolism. *Science* 146, 1172-1174
- Zamecnik, P.C., Stephenson, M.L., Janeway, C.M. & Randerath K. (1966) Isolation and Characterization of Dinucleoside Tetra- and Triphosphates formed in presence of Lysyl-sRNA Synthetase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 42; 98-105
- Zamecnik, P.C., Rapaport, E. & Baril, E.F. (1982) Priming of DNA Synthesis by Diadenosine 5', 5'''-p¹, p⁴-tetraphosphate with a double-stranded octadecamer as a template and DNA Polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 1791-1794

Lebenslauf

Am 13.12.1954 wurde ich, Anna Hedl, als Tochter des Diplom-Ingenieurs Johannes Hedl und dessen Ehefrau Magdalena, geb. Popova in Sofia geboren. Ostern 1961 wurde ich in die Katholische Volksschule in Elsdorf/Rhld. eingeschult und besuchte sie bis Ostern 1963.

Von September 1963 bis Juli 1965 besuchte ich die Bayernschule in München und anschließend das Sophie-Scholl-Gymnasium. Hier machte ich 1974 mein Abitur.

Im WS 1974/75 begann ich mit dem Studium der Biologie (Schwerpunkt Biochemie) an der Ludwig-Maximilians-Universität in München und schloß 1981 mit dem Diplom ab.

Im WS 1979/80 begann ich mit dem Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München.

Im August 1981 legte ich die ärztliche Vorprüfung ab .

München, 1984

